Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. D. Henschler

Bildung und Rückbildung von Methämoglobin bei Inhalation von Stickstoffmonoxyd-Luftgemischen

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Hermann Ulrich Mangold
aus Stuttgart

Würzburg 1967

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. D. Henschler

Bildung und Rückbildung von Methämoglobin bei Inhalation von Stickstoffmonoxyd-Luftgemischen

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Hermann Ulrich Mangold
aus Stuttgart

Würzburg 1967

Referent: Professor Dr. D. Henschler

Tag der Promotion: 21. 12. 67

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A) Einleitung	1
I. Chemie nitroser Gase	3
II. Entstehungsmöglichkeiten nitroser Gase	5
III. Frühere Untersuchungen mit Stickstoffmonoxyd	7
B) Problemstellung	11
C) Methämoglobinspiegel bei Stickstoffmonoxydeinatmung	13
I. Methodik	13
1. Tiermaterial	13
2. Herstellung von Stickstoffmonoxyd	14
3. Herstellung definierter, strömender Gemische von Stickstoffmonoxyd in Luft	14
4. Bestimmung von Stickstoffmonoxyd in Luft	16
a) Physikalische Bestimmung	16
b) Chemische Bestimmung	18
5. Vorrichtung zur Exposition der Tiere	20
6. Methämoglobinbestimmung	21
7. Versuchsauswertung	23

Seite

II. Ergebnisse 25

1. Zuverlässigkeit der Stickstoffmonoxydbestimmung 25

2. Bildungsgeschwindigkeit von Methämoglobin in vivo 27

3. Stickstoffmonoxydkonzentration in der Einatmungsluft und Ausmaß der Methämoglobinbildung 32

4. Rückbildung von Methämoglobin in vivo 36

a) Nach Stickstoffmonoxydinhalation 36

b) Nach intravenösen $NaNO_2$- Gaben 37

D) Diskussion 40

E) Zusammenfassung 44

F) Literatur I-III

A) EINLEITUNG

Nitrose Gase sind Gemische der verschiedenen Oxyde des Stickstoffs. Toxikologisch betrachtet, wirken sie als Blutgifte und als Lungengifte. Die Blutgiftwirkung entfaltet sich am Hämoglobineisen, das aus der zweiwertigen in die dreiwertige Stufe übergeführt wird. Mit der Oxydation ist der Verlust an Nebenvalenzen des Eisens verknüpft, die allein eine reversible Bindung von molekularem Sauerstoff zum Blutfarbstoff vermitteln. Das Methämoglobin (Hämiglobin, Met-Hb) fällt mithin für den Sauerstofftransport aus. Der Organismus vermag aber Met-Hb enzymatisch zu Hämoglobin zurückzuverwandeln.

Die eigentliche Lungengiftwirkung wird unter den nitrosen Gasen dem Stickstoffdioxyd NO_2 bzw. seinem Dimeren, dem N_2O_4, zugeschrieben. Aber auch dieses Stickstoffoxyd ist in der Lage, Methämoglobin (Met-Hb) zu bilden. Vor dem Übertritt des Gases ins Blut bieten die feuchten Atemflächen in der Lunge günstige Bedingungen für die Hydrolyse zum Nitrit-Ion, das entsprechend seinem leichten Übergang in eine höhere Oxydationsstufe in Gegenwart von Blutfarbstoff und Sauerstoff zu Nitrat aufoxydiert. Diese Reaktion aktiviert den Sauerstoff, der dann unmittelbar methämoglobinbildend wirkt. Es bestünde aber auch die Möglichkeit, daß unhydrolysiertes Gas mit dem roten Blutfarbstoff unmittelbar in Beziehung tritt; denn es ist bekannt, daß die Hydrolyse von NO_2-Gas ausgesprochen träge verläuft.

Auch die Bildung von Met-Hb bei Inhalation von reinem Stickstoffmonoxyd nimmt ihren Weg über NO_2. An welcher Stelle die Aufoxydation erfolgt, ist nicht sicher bekannt. Sie scheint einmal vor oder während der Diffusion des Gases ins Blut denkbar, wahrscheinlich stellt aber das Oxyhämoglobin den Sauerstoff für die Oxydation bereit.

Eine grundsätzlich andere Wirkungsqualität nitroser Gase manifestiert sich an den Wänden des Atemtraktes. Vermöge ihrer geringen Wasserlöslichkeit können Stickstoffoxyde auch die feinsten Verästelungen der Atemwege erreichen und dort mit Strukturelementen der Lungenkapillaren reagieren. Die resultierende Extravasation in den interstitiellen Raum, die in dem dort normalerweise herrschenden Unterdruck zudem ein unterstützendes Moment findet, bewirkt eine gravierende Behinderung der Sauerstoffdiffusion. Damit wird die Versorgung der Kapillarendothelzellen mit Sauerstoff stark eingeschränkt, so daß sie weitergreifende, mit verstärktem Flüssigkeitsaustritt verbundene Schädigungen erfahren. Eine Inhalation höherer Dosen nitroser Gase bringt somit einen circulus vitiosus in Gang.

Nach dem Übergreifen des Ödems auf die alveolären Lungenräume vermag das Durchperlen der Flüssigkeit mit Atemluft eine starke Schaumbildung hervorzurufen. Der Schaum kann hochwandern und damit die Gefahr einer Obstruktion der Atemwege in sich bergen.

Zwischen der Inhalation des Reizgases und dem vollentwickelten Bild des Lungenödems verstreicht in typischen Fällen eine Latenzzeit von Stunden bis weni-

gen Tagen. Meist bestehen in diesem Intervall lediglich lokale Reizerscheinungen am Atemtrakt, die über die Gefährlichkeit der Vergiftung völlig falsche Vorstellungen vermitteln. Infolge der außerordentlich geringen Warnwirkung des Stickstoffdioxyds (HENSCHLER, STIER, BECK u. NEUMANN 1960), müssen beim Verdacht einer Nitrosevergiftung Symptome wie Kratzen im Hals, hartnäckige Hustenanfälle, Atembeklemmung oder allgemeine Benommenheit bereits als Zeichen einer bedrohlichen Intoxikation gewertet werden. Die Erkrankung endet bei entsprechender Schwere in einer akuten Erstickung oder möglicherweise mit einem Versagen des rechten Herzens.

Wird das akute Lungenödem überlebt, so schafft die herabgesetzte Resistenz des Atemsystems einen guten Boden für mannigfache Nachkrankheiten und Spätkomplikationen. Bronchopneumonische Infiltrationen mit Abszedierungen, rezidivierende Bronchitiden und schließlich die Bronchiolitis obliterans sind als typische Spätfolgen von Nitrosevergiftungen anzusprechen.

I. Chemie nitroser Gase.

NO entsteht endotherm aus der Vereinigung der Elemente N_2 und O_2 bei Temperaturen von rund 5000°C. Einmal gebildetes NO bleibt unterhalb von 700°C stabil. Im Bereich tiefer Temperaturen neigt NO zur Dimerisation. Diesen Befund erbrachten infrarotspektroskopische Untersuchungen von FATELY u. Mitarb. (1959).

Dem farblosen Stickstoffmonoxydgas ist eine starke Tendenz zur Autoxydation eigen. Bei diesem Geschehen handelt es sich keineswegs um einen rasch ablaufenden Vorgang. Die Umsetzungsgeschwindigkeit steht vielmehr in Abhängigkeit zur Gaskonzentration, dem Sauerstoffüberschuß und der Temperatur. Die Kenntnis der quantitativen Umsetzungsrate von NO zu NO_2 basiert auf Untersuchungen von BODENSTEIN (1918), die später ihre Bestätigung fanden. Ein Maß für die Geschwindigkeit der Reaktion ist die Halbwertszeit. Sie ist als Zeit definiert, die für eine bestimmte Konzentration bis zu 50 %iger Aufoxydation eines NO-Luftgemisches zu NO_2 vergeht. Für geringe Konzentrationen ist die Halbwertszeit relativ groß. Bei 100 ppm in Luft beläuft sie sich auf 34 Minuten, bei 50 ppm auf 70 Minuten, und Gasluftgemische mit 25 ppm NO sind nach 1 Stunde erst zu 8% in NO_2 umgewandelt. Nitrose Gase können demnach, sofern sie mit hohen Anteilen an NO entstehen, eventuell vorwiegend als Monoxyd einwirken.

NO_2 gilt nach dem derzeitigen Stand der Erkenntnis als Träger der Reizwirkung nitroser Gase. Sein Geruch ist charakteristisch süßlich bis stechend, die Farbe je nach Konzentration gelbbraun bis braunschwarz. Eine Reduktion beginnt bei Temperaturen um 200° C; über 650° C existiert praktisch nur noch NO. NO_2 steht mit N_2O_4 im Gleichgewicht:

$$2\ NO_2 \rightleftharpoons N_2O_4 + 14{,}7\ Cal$$

Entsprechend der positiven Wärmetönung verschiebt sich der Schwerpunkt der Reaktion mit steigender Temperatur nach links, mit fallender nach rechts. Farbänderungen

begleiten die Umsetzung; denn reines N_2O_4 ist farblos. Als weiterer Faktor kommt die Konzentration der Stickstoffoxyde in Luft ins Spiel. Bei wenigen Hundert ppm und Normaltemperatur liegt praktisch nur NO_2 vor.

Von geringerer Bedeutung für Fragen der Luftverunreinigung sind die Stickstoffoxyde N_2O_3 und N_2O_5: N_2O_3 tritt nur an bestimmten Emissionsorten auf und zerfällt in niedrigen Konzentrationen rasch zu NO und NO_2. Ebenso ist N_2O_5 normalerweise nicht haltbar; allenfalls unter den außergewöhnlichen Bedingungen seiner Entstehung: In Gegenwart von Ozon kann es aus NO_2 gebildet werden.

II. Entstehungsmöglichkeiten nitroser Gase.

Für die E n t s t e h u n g nitroser Gase bietet die industrialisierte Arbeitswelt vielfältige Möglichkeiten. Bei quantitativer Betrachtung müssen die großtechnischen Verfahren der Ammoniakverbrennung zur Salpetersäureherstellung, Nitrierungs- und Denitrierungsprozesse, die Zelluloseproduktion und die Trinitrotoluolerzeugung als Hauptbildungsquellen angesehen werden. Im allgemeinen werden aber an diesen Bildungsorten aufgrund strenger Handhabung bestehender Arbeitsschutzbestimmungen Vergiftungsmöglichkeiten nur bei menschlichem oder technischem Versagen oder bei Katastrophenfällen auftreten.

Spezielle Arbeitsverfahren in der Technik, die mit

einem Einwirken von Salpetersäure auf Metalle verbunden sind, wie das sogenannte Metallbeizen oder Gelbbrennen von Kupfer und Messing, die Zinkographie, die Kupferstecherei oder die weitverbreitete Verwendung von Salpetersäure zu allen möglichen Reinigungsprozessen, werden oft in Verkennung ihrer wahren Gefährlichkeit ohne ausreichende Schutzmaßnahmen ausgeführt. Gerade sie haben sich als eine besondere Gefährdung für den dort arbeitenden Menschen erwiesen.

Auch der leichtfertige Umgang mit Salpetersäure läßt oft toxische Nitrosegaskonzentrationen entstehen. Eine besondere Gefährlichkeit entfaltet dabei ihr Kontakt mit organischen Stoffen, weil mit einer partiellen Reduktion sehr rasch beträchtliche Mengen von Stickoxyden freiwerden können.

In landwirtschaftlichen Betrieben sind neuerdings im Zusammenhang mit der Einsilierung von Getreide Vergiftungen durch nitrose Gase erkannt worden, die in das amerikanische Schrifttum als "silo fillers´disease" aufgenommen wurden. Die Silierung verläuft als anaerober, von Bakterien unterhaltener Gärprozeß. Dabei werden durch die Fermentation Stickstoffoxyde aus anorganischen Nitraten freigesetzt. Eine intensive Stickstoffdüngung gewinnt in diesem Rahmen besondere Bedeutung, weil sie unverhältnismäßig hohe pflanzliche Nitratgehalte entstehen läßt.

Autogenes und elektrisches Schweißen, sowie die Abgase von Triebwerken und Verbrennungsmotoren bilden weitere Entstehungsmöglichkeiten für Stickstoffoxyde. Die dort erzeugten nitrosen Gase entstehen mit hohen

Anteilen an NO.

Von schweren Nitrosevergiftungen beim Aufenthalt in Geschütztürmen von Kriegsschiffen berichtete PFLESSER (1935) : Die Mannschaften waren mit Schutzmasken ausgerüstet und atmeten nitrosehaltige Gefechtsgase ein, die an den Kohlefiltern zu Monoxyd reduziert wurden. Die Vergiftungsbilder der Erkrankten waren von schweren Methämoglobinämien beherrscht und endeten in einer ganzen Reihe von Fällen tödlich.

Zusammenfassende Darstellungen von bisher publizierten Untersuchungen und Erfahrungen über die mannigfachen Entstehungs-und Vergiftungsmöglichkeiten mit nitrosen Gasen sind von HAHN (1960), LÜTGE (1961) und STOCK (1965) erarbeitet worden.

III. Frühere Untersuchungen mit Stickstoffmonoxyd.

Die Wirkungen von NO und NO_2 sind grundverschieden. Bei vergleichenden Studien über Toxizität und Wirkungscharakter von möglichen Bestandteilen nitroser Gase sah FLURY (1930) bei NO keinerlei lokale Reizwirkungen. Selbst bei Inhalation hoher Konzentrationen traten Lungenödeme nie auf. Neben starker Met-Hb-Bildung wurden dagegen zentrale Lähmungen beobachtet, wie sie von erstickenden Gasen vom Typ des Kohlenmonoxyds bekannt sind. Besonders charakteristisch war das Vergiftungsbild bei weißen Mäusen. Diese

zeigten infolge starker Zyanose eigentümliche Verfärbungen der Augen, Ohren, des Schwanzes und der Pfoten. Bei rechtzeitigem Entfernen aus der Gasatmosphäre erholten sich die Tiere wieder rasch.

Die Kenntnis der differenten Wirkungsqualitäten von NO und NO_2 bewog FLURY, das klinische Bild akuter Nitrosevergiftungen beim Menschen je nach Überwiegen der einen oder anderen Gaskomponente in folgende 4 typische Verlaufsarten aufzugliedern:

1. Reizgastypus
2. reversibler Typus
3. Schocktypus
4. kombinierter Typus

Met-Hb-Bildung und zentralnervöse Erscheinungen bei Typus 2 und 3 sollen Folgen der Inhalation größerer Mengen von NO sein, während die NO_2-Wirkung sich im Typus 1 mit Reizerscheinungen am Atemtrakt niederschlägt. Die Einatmung entsprechender Gemische beider Gase hätte dann den kombinierten Typus 4 zur Folge.

Die Entstehung von Stickoxydhämoglobin, das theoretisch nach Stickstoffmonoxydinhalation resultieren könnte, ist nach FLURY u. ZERNIK (1931) am lebenden Tier nie beobachtet worden. Vermutlich wird es vom Blutsauerstoff sofort in Met-Hb umgewandelt. Die Verbindung bildet sich aber postmortal nach tödlichen Nitrosevergiftungen aus dem im Blut enthaltenen Nitrit.

PFLESSER (1935) erweiterte die Versuche FLURYs und

stellte bei Konzentrationen zwischen 1200 und 4500 ppm Tödlichkeitsprodukte für NO einerseits, für NO_2 andererseits auf. Ihre graphische Darstellung wies für NO einen hyperbolischen Verlauf, für NO_2 praktisch eine Gerade auf. Die Resultate wurden mit einer Strömungsanlage erarbeitet, die vergleichbare Toxizitätsangaben für beide Gasarten gestatten sollte. Als Versuchstiere dienten Mäuse. Aus seinen Befunden leitete PFLESSER eine 4-5 mal stärkere Giftigkeit des NO gegenüber NO_2 ab.

Begasungen mit geringeren NO-Dosierungen überlebten alle Tiere ohne Vergiftungserscheinungen, wenn die Konzentration unter 310 ppm blieb, während über 350 ppm alle starben. Bei 320 ppm verendete noch die Hälfte der Tiere im Versuch. Das Vergiftungsbild entsprach durchweg den Beobachtungen FLURYs. An makroskopisch untersuchten Lungen von verendeten Tieren fehlte jedes Anzeichen von Ödemen.

Das Ausmaß der Met-Hb-Bildung vermöchte PFLESSER nicht zu erfassen. Lediglich Blutproben von Tieren, die mehr als 310 ppm NO inhaliert hatten, wurden spektroskopisch positiv beurteilt.

Aufgrund der relativ ungenauen Bestimmungsmethoden für Stickstoffoxyde müssen die aufgeführten Befunde zurückhaltend bewertet werden. Namentlich ein Toxizitätsvergleich zwischen NO und NO_2 wird problematisch; denn die Analysenverfahren konnten nicht zwischen NO und NO_2 differenzieren. Wir wissen heute, daß PFLESSER nicht reines NO_2, sondern ein NO/NO_2-Gemisch unbekannter Zusammensetzung angewendet hat.

Mit spektralphotometrisch und chemisch-analytisch überwachten, abgestuften NO- Dosierungen ermittelte STOCK (1965) die Mortalität nach einer 6-stündigen Inhalation an Mäusen. Dabei zeigte sich, daß bei weniger als 200 ppm NO alle Tiere überlebten, während oberhalb von 300 ppm alle ad exitum kamen. Aus den Ergebnissen konnte eine LC 50 von 247 ppm (231-264 ppm) errechnet werden. Ausschließliche Todesursache der Versuchstiere war eine Methämoglobinämie, wobei der tödliche Methämoglobinspiegel nur wenig um den durchschnittlichen Wert von 66,8 % schwankte. Er blieb unabhängig von Expositionsdauer, Überlebenszeit und der Gaskonzentration. Eine Ödembildung ließ sich in Schnittserien von Lungen verendeter Tiere auch nicht andeutungsweise erkennen. Die Methämoglobinbildung in Abhängigkeit von der Gasdosierung folgte einem sigmaförmigen Anstieg. Erst ab Konzentrationen von 40-50 ppm NO erhöhte sich der normale Methämoglobinspiegel um einen meßbaren Betrag. Alle Methämoglobinwerte wurden mit einer zuverlässigen spektralphotometrischen Bestimmungsmethode ermittelt. Mit einer speziellen Versuchsanordnung ist Methämoglobin als solches nachgewiesen worden. Für das Vorliegen von NO-Hb und Nitrit-Met-Hb ergaben sich keine Anhaltspunkte.

B) PROBLEMSTELLUNG

Nitrose Gase erlangten bei Erörterungen über die Reinhaltung der Luft in Großstädten und Industriezentren und namentlich bei der Beurteilung von Luftverunreinigungen an Arbeitsplätzen in den letzten Jahren erneut größere Bedeutung. Stickstoffmonoxyd kann unter bestimmten Umständen den Hauptanteil dieser Schadstoffe stellen, wenn diese nämlich mit hohem Anteil an NO entstehen und schon kurz nach der Bildung eingeatmet werden. Eine hohe Verdünnung in Luft tritt als zusätzliches Moment ins Spiel, weil dadurch die Umwandlung zu NO_2 sehr verlangsamt wird. Beide Gasarten treten mit dem roten Blutfarbstoff in Beziehung und führen ihn in Methämoglobin über.

Untersuchungen von LÜTGE (1961) mit Stickstoffdioxydgas ergaben, daß bei Mensch und Hund erst die Einatmung von NO_2 -Luftgemischen mit 20 ppm den Methämoglobinspiegel gegenüber den Ausgangswerten meßbar erhöhte, 10 ppm ließen ihn unverändert.

Der vorliegenden Arbeit war nun die Aufgabe gestellt worden, den Einfluß von NO -Inhalationen auf den physiologischen Methämoglobinspiegel messend zu verfolgen. Dazu galt es zu ermitteln, in welchem Ausmaß sich das Methämoglobin bei variierten Begasungszeiten mit gleichbleibender NO -Konzentration verändert. Dann sollte nach Erreichen eines Gleichgewichtes die Met-Hb-Rückbildung bis zum Ausgangswert verfolgt werden. Schließlich sollte nach intravenösen

$NaNO_2$- Gaben der Met-Hb- Abbau untersucht und den Befunden mit NO vergleichend gegenübergestellt werden.

Die Untersuchungen von STOCK (1965) zur Ermittlung der Methämoglobinbildung nach 6stündigen NO-Inhalationen wiesen in entscheidenden Bereichen Lücken auf. Einmal gestatteten die Resultate keine sichere Aussage über die tatsächliche Tendenz des Ansteigens von Methämoglobin und über die NO- Grenzkonzentration, die eben meßbar den Methämoglobinspiegel verändert. Zum anderen sollte der Übergangsbereich zwischen steil ansteigenden und horizontal verlaufenden, tödlichen Methämoglobindurchschnittswerten genauer erfaßt werden.

C) METHÄMOGLOBINSPIEGEL BEI STICKSTOFFMONOXYDEINATMUNG

I. Methodik.

1. Tiermaterial

Als Versuchstiere wurden weibliche, geschlechtsreife, weiße Inzuchtmäuse vom Stamm NMRI herangezogen, die uns die Gesellschaft für Versuchstierzucht, Hannover, zur Verfügung stellte. Auf eine Gewichtsbestimmung der einzelnen Tiere vor Versuchsbeginn wurde verzichtet, da die Resultate der Auswertung, die jeweils 10 Tiere erbrachten, zu einem Durchschnittswert zusammengefaßt wurden.

Wir waren bestrebt, für geschlossene Versuchsreihen möglichst gleichwertige Tiere in Versuch zu nehmen, namentlich solche, die gemeinsam angeliefert worden waren. Als Nahrung erhielten sie ein standardisiertes Preßfutter (ssniff MS) und in Trinkflaschen angebotenes Leitungswasser. Die Tiere wurden, zu Gruppen aufgeteilt, in geeigneten Käfigen in einem Klimaraum gehalten. Dort konnte eine Konstanz der Temperatur von 25° C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 70% ständig aufrechterhalten werden.

2. Herstellung von Stickstoffmonoxyd.

Reines NO wird durch Zugeben von H_2SO_4 zu einer $NaNO_2$- Lösung gewonnen. Die Darstellung der Reaktion kann nach folgenden Gleichungen erfolgen:

$$H_2SO_4 + NaNO_2 = NaHSO_4 + HNO_2$$

$$3\ HNO_2 = HNO_3 + H_2O + 2\ NO$$

In einen geeigneten Glaskolben, in den 30 %ige $NaNO_2$-Lösung eingebracht worden ist, läßt man langsam unter anhaltendem, kräftigem Rühren eine 50 %ige H_2SO_4 zutropfen. Das freigesetzte NO- Gas wird beim Durchleiten durch eine doppelte Schwefelsäurevorlage von mitgebildetem N_2O_3 und NO_2 bzw. N_2O_4 befreit und in einem Gasometer über gesättigter NaCl- Lösung zur Verwendung bereitgehalten.

3. Herstellung definierter,strömender Gemische von NO in Luft.

Die für die einzelnen Versuche jeweils gewünschten NO- Luftgemische konnten unter Verwendung von einem in Abb. 1 schematisch dargestellten Strömungssystem erzeugt werden. Das im Gasometer G vorrätig gehaltene NO wird mit Hilfe einer Mariotte´schen Flasche M

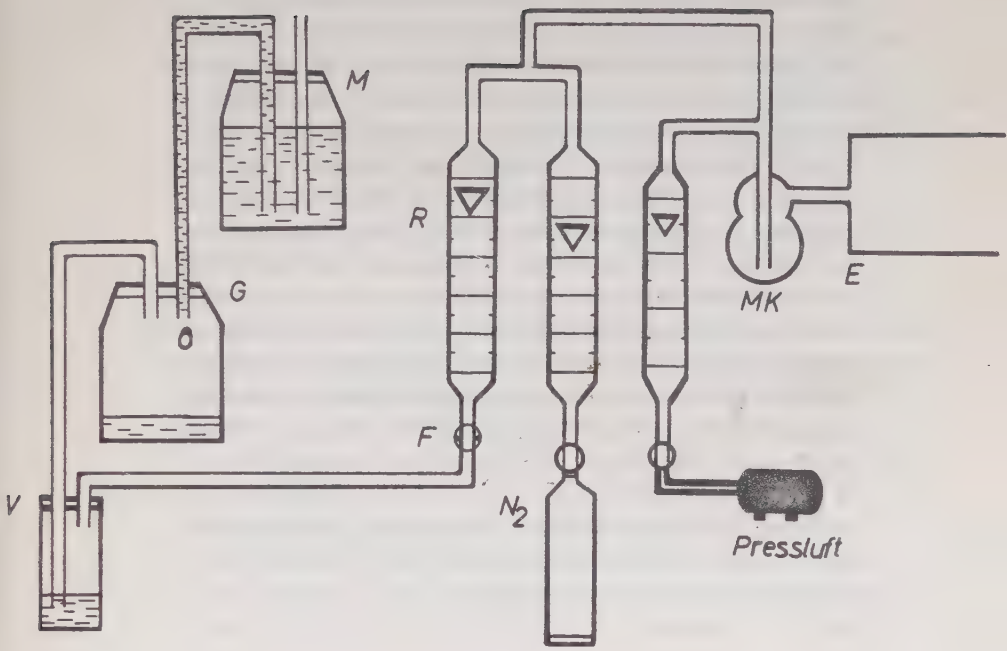


Abb.1: Schematische Darstellung der Versuchsanlage zur Herstellung definierter Konzentrationen von NO in Luft. Einzelheiten und Erläuterung der Symbole im Text.

druckkonstant über H_2SO_4-Vorlage V, Feindosierventil F und Rotameter R einem die Autoxydation zuverlässig verhindernden Stickstoffstrom zugeleitet, der zudem den Weitertransport beschleunigt. Dieses NO/N_2-Gemenge wird in einer Mischkugel MK mit großen Volumina (ca. 2400 l/Std) Frischluft zum endgültigen Gasluftgemisch verdünnt, das dann auf kürzestem Weg in die Expositionsvorrichtung E strömt. Mit Hilfe eines nachgeschalteten Spektralphotometers vom Typ Beckman DK II können fortlaufend Gaskonzentrationsbestimmungen durchgeführt werden. Der aus dem Gerät zurückfließende Gasstrom gelangt zur Vernichtung in eine eigene Abzugsanlage. Die zur Gasverdünnung herangezogene Frischluft entstammt einer druckkonstanten Hauspreßluftleitung, die von einer Wasserringpumpe gespeist wird. Das Aggregat liefert öl- und geruchsfreie Luft von 50 bis 55% relativer Feuchte. Reduzierventile gestatten eine dosierte Entnahme. Die gesamte Anlage, einschließlich des zu ihrem Aufbau verwandten Materials, ist bereits von STOCK (1965) eingehend beschrieben worden.

4. Bestimmung von NO in Luft.

a) Physikalische Bestimmung.

Zur Gehaltsbestimmung von Gasen in Luft besitzt die

Spektralphotometrie, als ein methodisch einfaches und mit hinreichender Genauigkeit arbeitendes Verfahren, besondere Vorzüge. Für Konzentrationsbestimmungen von NO bietet sich ein ausgeprägtes, scharfes Absorptionsmaximum dieses Gases bei einer Wellenlänge von 214,65 mμ an. Im Strahlengang eines Zweistrahlphotometers stehen eine Meß- und eine Vergleichsküvette. Über ein optisches System wird durch sie je eine Hälfte eines Lichtstrahls geleitet, den eine Wasserstofflampe emittiert und der aus einem Quarzprisma monochromatisch abgegriffen wird. Zwei nachgeschaltete Photozellen wandeln die vom Gas nicht absorbierte Energie in Impulsströme um, deren Differenz mittels eines Schreibwerkes aufgezeichnet werden kann. Zwischen diesem elektrischen Potential und der gesuchten Gaskonzentration besteht umgekehrte Proportionalität.

Der Vorteil dieses Systems ist in der Möglichkeit zu erblicken, während des gesamten Versuchsablaufes die Konstanz der einmal gewählten Konzentration überwachen und die Nullpunktkonstanz stets kontrollieren zu können.

Umfangreiche Verfeinerungen der Methode komplizierten jedoch den Aufbau der Apparatur. So bot die Küvette unseres Gerätes einige Störanfälligkeiten, und der Aussagewert der ermittelten Gasgehalte sollte deshalb kritisch beurteilt werden. Neben einem regelmäßigen Beschlagen der optischen Flächen der Küvette, was ein Nachregulieren der Empfindlichkeit des Gerätes zur Konstanterhaltung der einmal gewählten Spaltbreite erforderlich machte, erbrachten

selbst geringe Erschütterungen unerwünschte Ausscherungen der Instrumentenanzeige aus der eingestellten Null- Linie.

Die Anlage mußte deshalb so aufgebaut werden, daß eine Eichung jederzeit zu wiederholen war, ohne den Versuchsablauf zu stören. Dazu konnte nach Umstellen zweier Hähne in die Küvette Luft eingeblasen und gleichzeitig der Gasstrom am Meßgerät vorbeigeleitet werden.

Die Zuordnung bestimmter Gaskonzentrationen zu den vom Schreibwerk aufgezeichneten Resultaten, erfolgte anhand einer Eichkurve. Zu ihrer Festlegung wurden bei jeweils konstanten NO- Dosierungen Gasproben nach Passage des Meßgerätes abgezogen und chemisch-analytisch aufgearbeitet.

b) Chemische Bestimmung.

Für eine Bestimmung geringer und auch relativ hoher NO- Konzentrationen kann die Phenoldisulfonsäuremethode in der von JACOBS (1960) beschriebenen Modifikation als zuverlässiges Verfahren zur quantitativen chemischen Gasanalyse von Stickstoffmonoxyd angesehen werden. Zu einer Differenzierung der verschiedenen Stickstoffoxyde ist jedoch auch diese Methode nicht befähigt. Sowohl NO als auch eventuelle Beimischungen von NO_2 bzw. N_2O_4 erfahren durch H_2O_2 eine Aufoxy-

dation zu Nitraten, die dann komplett in die Nitrierungsreaktion der Phenoldisulfonsäure einbezogen werden. Die optische Dichte des gelben Farbstoffes, der bei dieser Umsetzung entsteht, wird in einem Beckman Photometer Modell B bei einer Wellenlänge von 400 mμ in 10 mm Küvetten gegen eine mitaufgearbeitete Leeranalyse ausgemessen. Aus den abgelesenen Extinktionen können anhand einer Eichkurve (bekannte Nitritmengen) die Gaskonzentrationen errechnet werden. Sie wurden dem internationalen Schrifttum folgend stets in ppm NO transponiert.

Einzelheiten zum Analysengang einschließlich der Umformung der Ergebnisse in ppm sind der Arbeit von STOCK (1965) zu entnehmen.

Die Methode hat den Nachteil, das Ergebnis frühestens nach 3 bis 4 Std zu liefern. Auf chemisch-analytische Überprüfungen der jeweils angestrebten NO-Dosierungen vor den Expositionen wurde deshalb verzichtet.

Bei der nachträglichen Auswertung der Beleganalysen konnten indessen mitunter Differenzen zwischen spektralphotometrisch eingestellten und chemisch-analytisch erfaßten Gehalten von NO aufgedeckt werden. Die den Versuchen zugeordneten NO-Konzentrationen basieren durchweg auf den Resultaten der chemischen Bestimmungsmethode. Näheres wird im Versuchsteil beschrieben.

5. Vorrichtung zur Exposition der Tiere.

Bei der Exposition von Mäusen in regelrechten, dichtschließenden Käfigen ist ein Einwirken des Gases auf das Tierfell in keinem Fall zu vermeiden. Untersuchungen von HENSCHLER u. Mitarb. (1960) lehrten aber, daß die reaktiven Stickstoffoxyde von den Tierhaaren in erheblichem Maße gebunden werden. Um solchen schwer zu bewertenden Fehlerquellen auszuweichen, verbrachten wir jedes unserer Versuchstiere vor Expositionsbeginn in eine Hülse, deren vorderer Teil mit einem durchbohrten Metallkonus fest verschraubt war. Der Durchmesser dieser aus durchsichtigem Kunststoff gefertigten Röhren war so gewählt worden, daß den Tieren einerseits eine beschränkte Bewegungsmöglichkeit verblieb, zum anderen aber ein Zurückwenden des Kopfes unterbleiben mußte. In die Hülsen konnte ein gut abdichtender Stempel nachgeschoben werden. Die Mäuse waren damit gezwungen, ihre Schnauze durch die Konusöffnung zu halten. Diese Hülsen ließen sich mit der eigentlichen Expositionskammer, einem röhrenförmigen Kubus aus PVC , über enggesetzte Bohrungen an dessen Seitenflächen gasdicht in Verbindung bringen.

Das beschriebene Verfahren zur Tierexposition bietet eine übersichtliche Anordnung und gestattet eine gute Beobachtung des Verhaltens der in Versuch genommenen Tiere auch über längere Zeit.

6. Methämoglobinbestimmung.

Eine erste orientierende Untersuchung auf Met-Hb-Vorkommen in Blutfarbstofflösungen kann mit einem einfachen Spektroskop geschehen. Dieses ungenaue Vorgehen eignet sich indessen nur für qualitative Proben auf Methämoglobin. Im roten Teil des Lichtspektrums besitzt das Met-Hb eine charakteristische Absorptionsbande, die bei spektroskopischen und spektrophotometrischen Untersuchungen erfaßt werden kann. Allerdings findet sich dieses Maximum nur in saurem Milieu; der Verlauf der Met-Hb- Absorptionskurve weist eine starke Abhängigkeit vom pH- Wert auf. Ein Zusatz von Cyanid führt Met-Hb sehr schnell komplett in Cyano- Met-Hb über. Mit der Umsetzung verschwindet die typische Met-Hb- Bande, da die neue Verbindung im Rot keinerlei Absorptionsmaxima aufweist. EVELYN u. MALLOY (1938) zogen diese Erscheinung für eine quantitative Bestimmung von Met-Hb heran. Unsere Meßmethode lehnt sich an dieses Verfahren. Im einzelnen wurde dabei folgendermaßen vorgegangen:

Zur Gewinnung von Mäuseblut wurde im Anschluß an die Exposition oder, wenn Tiere im Versuch starben, sofort nach Todeseintritt, der Kopf mit einem Scherenschlag abgetrennt. Etwa 0,4 g Blut, auf einer Schnellwaage gemessen, ließen wir dann in einen Erlenmeyerkolben eintropfen. In dieses Gefäß waren zuvor 30 ml eiskalte $\frac{m}{60}$- Phosphatpufferlösung nach SØRENSEN mit einem exakt auf 6,8 eingestellten pH-Wert ein-

gebracht worden. Nach leichtem Durchschütteln des Inhaltes bei verschlossen gehaltenem Kolben trat sehr rasch komplette Hämolyse ein. Geformte Blutbestandteile, die einmal bei der photometrischen Messung stören konnten, die zum anderen aber auch vermöge ihres Enzymgehaltes die Reduktion des gebildeten Methämoglobins einleiten konnten, wurden beim Zentrifugieren mit 3000 U/min zuverlässig vom Hämolysat befreit. Aus dem Zentrifugenglas mit insgesamt 30 ml Mäusebluthämolysat wurden nun sehr vorsichtig 4 Ansätze zu je 5 ml abpipettiert und in 50 ml fassende Erlenmeyerkolben verbracht. Die Ansätze erhielten jeweils Tropfen von Kaliumcyanid (10 %ige Lösung mit Essigsäure neutralisiert), Kaliumferricyanid (5 %ige Lösung) oder entsprechende Mengen nitritfreies Wasser zugesetzt. Einzelheiten sind aus folgendem Schema zu entnehmen:

Ansatz 1	Hämolysat + 2 Tropfen H_2O (unverändertes Hämolysat)
Ansatz 2	Hämolysat + 1 Tropfen $K_3(Fe(CN)_6)$ + 1 Tropfen H_2O (noch vorhandenes HbO_2 wird vollständig in Met-Hb überführt)
Ansatz 3	Hämolysat + 1 Tropfen $K_3(Fe(CN)_6)$ + 1 Tropfen KCN (noch vorhandenes HbO_2 und gebildetes Met-Hb werden in Cyano-Met-Hb überführt)

Ansatz 4 Hämolysat + 1 Tropfen KCN
+ 1 Tropfen H_2O
(Umwandlung des in der Maus gebildeten Met-Hb in Cyano-Met-Hb)

Für jeden Ansatz wurde im Beckman Spektrophotometer Modell B die Extinktion ermittelt. Ausgemessen wurde gegen Wasser bei einer Wellenlänge von 630 mμ. Die Schichtdicke betrug 10 mm. Aus den gefundenen Mittelwerten der mehrfach durchgeführten Einzelmessungen konnte nach der Formel

$$\frac{E_1 - E_4}{E_2 - E_3} \cdot 100 = \% \text{ Met-Hb}$$

der prozentuale Met-Hb- Gehalt im Mäuseblut rechnerisch bestimmt werden.

Zum Ansetzen der Lösungen sowie zum Spülen der Glasgeräte benützten wir nitritfreies, über $Ba(OH)_2$ und $KMnO_4$ destilliertes Wasser.

7. Versuchsauswertung.

Die für die einzelnen Expositionen vorgesehenen Gaskonzentrationen wurden anhand der vom Spektral-

photometer registrierten Werte eingestellt. Nach Erreichen der angestrebten Dosierung blieben die Einstellungen an der Strömungsanlage konstant, selbst wenn die Registrierung am Meßgerät im Laufe der Exposition auf andere Werte einpendelte.

In Abständen von rund 30 min wurden bei allen Versuchen Gasanalysen gezogen. Lediglich bei der Bestimmung der Met-Hb- Abbaugeschwindigkeit blieb die Ermittlung der inhalierten NO- Gehalte aus, da hier die Ausgangskonzentration von Methämoglobin mehr als die NO- Konzentration interessiert. In den Versuchsergebnissen ist immer der Mittelwert aller Analysen während eines Versuches angegeben. Zwischen dem Abziehen der Analysen wurden die Tiere beobachtet. Wenn Tiere im Versuch ad exitum kamen, wurde die Todeszeit notiert. Um nach Möglichkeit andere Todesursachen ausschließen zu können, sezierten wir sie nach der Blutentnahme.

Bei den Versuchen zur Ermittlung des Met-Hb- Spiegels nach Einatmung differenter NO- Konzentrationen bildeten je 10 Tiere eine Gruppe. Hingegen wurde die Bildungs- und Rückbildungsgeschwindigkeit des Met-Hb in vivo mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe messend verfolgt. Beim Studium des Met-Hb- Abbaues nach intravenösen $NaNO_2$- Gaben sind nur Dreiergruppen eingesetzt worden.

Alle Versuchstiere wurden wahllos in die verschiedenen Gruppen aufgeteilt. Innerhalb gleichbehandelter Versuchsgruppen wurde der Mittelwert errechnet und die Streuung als mittlerer Fehler vom Mittelwert

nach der Formel

$$\varepsilon = \pm \sqrt{\frac{d^2}{n(n-1)}}$$ angegeben (vgl. BURN 1937) .

In alle graphischen Ergebnisdarstellungen ist diese Streubreite vom Mittelwert eingezeichnet worden.

II. E r g e b n i s s e .

1. Zuverlässigkeit der Stickstoffmonoxydbestimmung.

Die exakte analytische Erfassung von Stickstoffmonoxyd in Luft stellte für die Bewertung unserer Untersuchungen eine wesentliche Voraussetzung dar. Zur Einstellung der Konzentrationen an der Strömungsanlage und zu ihrer fortlaufenden Überwachung während des Versuchsablaufes bot die direkte physikalische Bestimmung mit Hilfe des Beckman Spektralphotometers DK 2 entscheidende Vorteile. Parallel zu der spektralphotometrischen Registrierung sind jedoch stets chemisch-analytische Bestimmungen nach der Phenoldisulfonsäuremethode durchgeführt worden. In Abb. 2 wurden die Beckman- Registrierungen den entsprechenden Kontrollanalysen zugeordnet. Im Rahmen der üblichen Fehlerbreite fügen sich die anhand von Eichversuchen ermittelten

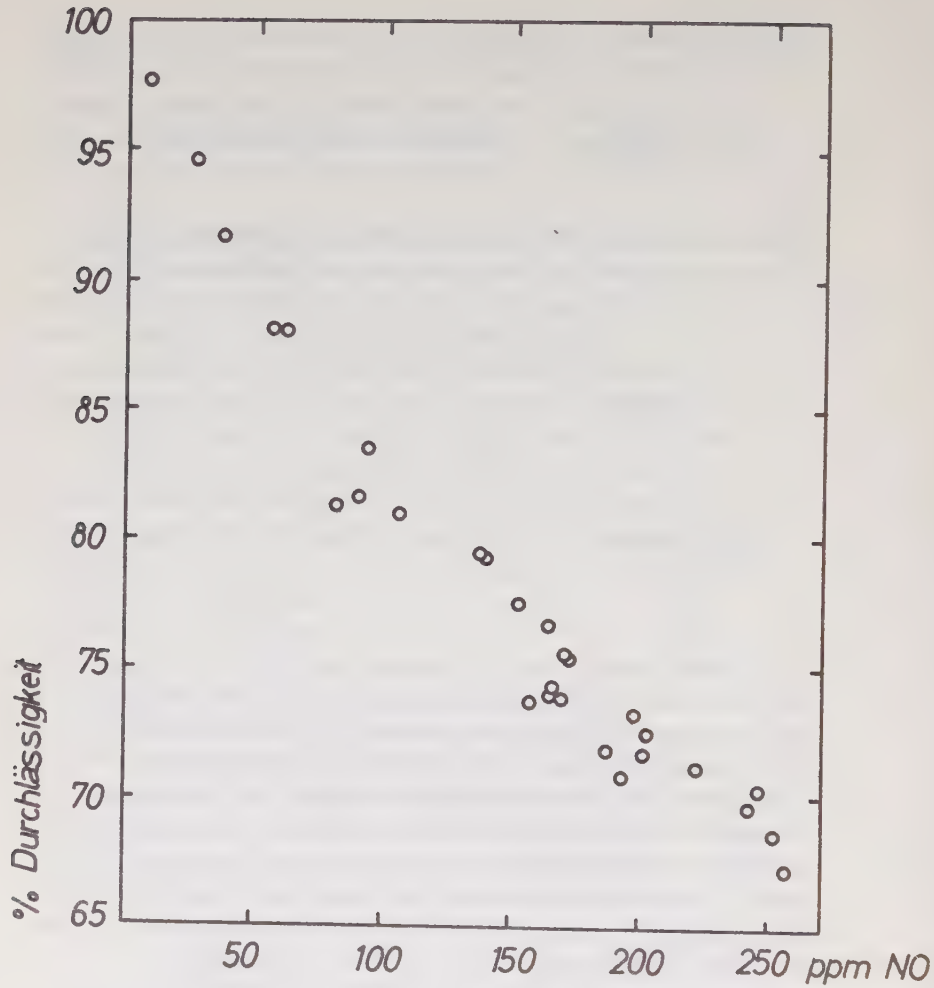


Abb.2: Zuordnung chemisch-analytisch bestimmter Stickstoffmonoxyd-Konzentrationen zur spektralphotometrischen Registrierung.
Beckman DK II, 214,65 mm, Spreizung 1:10.

Werte in die Charakteristik gut ein.

2. Bildungsgeschwindigkeit von Methämoglobin in vivo.

Zur Ermittlung der Bildungsgeschwindigkeit von Methämoglobin im Blut bei Inhalation definierter NO-Luftgemische exponierten wir Mäusegruppen zu je 4 Tieren über abgestufte Zeiten, wobei als längste Begasungszeit 6 Stunden, als kürzeste 10 Minuten gewählt wurden. Zwischen diesen beiden Extremen waren noch insgesamt 10 Termine eingeordnet. Unser besonderes Augenmerk richtete sich auf die Tendenz der Methämoglobinbildung innerhalb der ersten 2 Stunden; denn vermutlich vollzieht sich in diesem Bereich der rascheste Anstieg des Methämoglobins im Blut.

Insgesamt wurden 3 Versuchsserien mit jeweils verschiedenen, aber im Versuch stets konstant gehaltenen NO- Konzentrationen durchgeführt.

Unsere Anlage vermochte jedoch lediglich maximal 12 Mäuse, also 3 Tiergruppen gleichzeitig zur Exposition aufzunehmen. So wurde es notwendig, jede Versuchsreihe in 2 Teilabschnitte aufzugliedern. Es gelang jedoch, wie die chemischen Analysen ausweisen konnten, in befriedigender Weise, für jeden Teilversuch die angestrebte NO- Konzentration zu treffen.

Die Streubreite der ermittelten Methämoglobinwerte ist, bedingt durch die geringe Tierzahl pro Gruppe, relativ groß, sie wird aber bei kurzen und langen Begasungszeiten deutlich geringer.

Im einzelnen ergaben die Versuche folgende Resultate:

Die Konzentration von 202,7 ± 1,7 ppm NO war in Anlehnung an die von STOCK (1965) beobachteten Met-Hb- Bildungen bei 6stündigen Expositionen in der Absicht gewählt worden, eine zwar hohe, aber nicht tödliche Methämoglobinämie im Tierkörper hervorzurufen. Die ausgewerteten Ergebnisse sind zur Übersicht in Abb. 3 aufgezeichnet. Demnach erfährt der Met-Hb- Blutspiegel in der Tat unmittelbar nach Expositionsbeginn seinen steilsten Anstieg. So kann bereits nach 20 min eine Konzentration von 18 % gemessen werden. Im weiteren Verlauf sinkt die Bildungsgeschwindigkeit jedoch kontinuierlich ab. Die Kurve strebt dabei einem praktisch konstant bleibenden Met-Hb- Spiegel zu, der ungefähr nach 4 Std Exposition erreicht wird. Der Met-Hb- Gehalt ist nach dieser Begasungszeit auf 58 % angestiegen. Er erfährt aber selbst bei noch wesentlich längerdauernder Stickstoffmonoxydeinatmung keine signifikante Steigerung mehr. Der geringe Zuwachs um 0,6 % nach 6 Std Exposition liegt innerhalb der Fehlerbreite der Methode.

Bei einer durchschnittlichen NO- Konzentration der Teilversuche von 166,0 ± 2,3 ppm und 166,5 ± 2,2 ppm NO konnte mit einer Bildung von maximal 30-40 % Met-

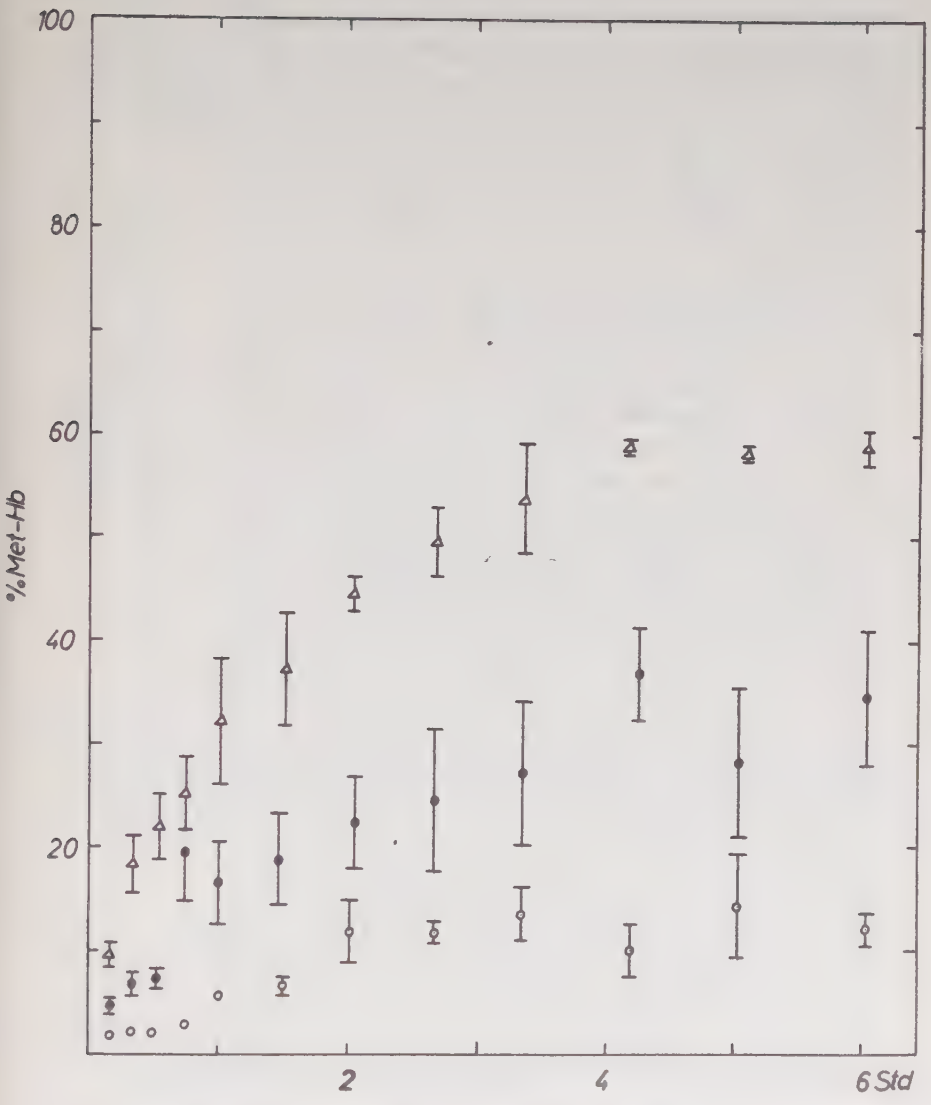


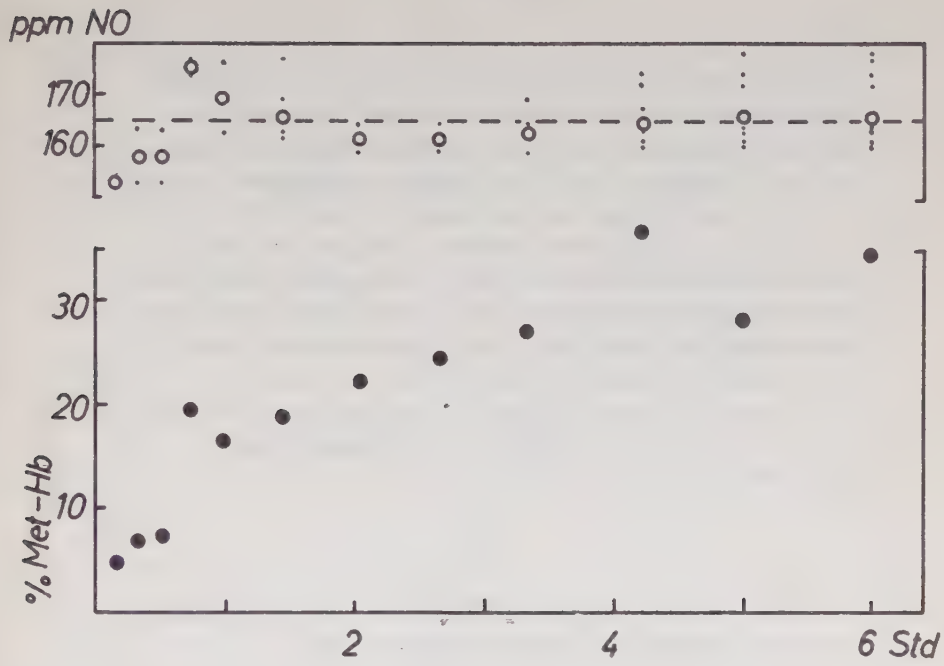
Abb.3: Methämoglobin-Gehalt im Mäuseblut nach Inhalation konstanter Konzentrationen von Stickstoffmonoxyd.

△ 202,7 ppm NO ● 166,3 ppm NO ○ 114,7 ppm NO

hämoglobin gerechnet werden, die sich wiederum nach einer Inhalationszeit von etwa 4 Std entwickelt hatten. Die ebenfalls in Abb. 3 graphisch aufgeführten Resultate dieser Versuchsreihe lassen demnach einen der Kurve bei 202 ppm NO analogen Verlauf der Methämoglobinbildungsgeschwindigkeit erkennen, der Endwert wird möglicherweise später erreicht.

Die Werte für Expositionen von 4 Std 10 min und 5 Std fallen mit 36,7 ± 4,6 bzw. 28,2 ± 7,4 % Met-Hb etwas aus der Reihe, was bei der geringen Zahl von nur 4 Einzelbeobachtungen an sich nicht verwundert. Demgegenüber konnte für die ebenfalls nicht in das Allgemeinbild passenden Met-Hb- Werte bei 32 min und 45 min eine konkrete Erklärung gefunden werden. Bei der Exposition der betreffenden Tiergruppen wies die NO- Konzentration, wie chemisch-analytisch belegt werden konnte, Differenzen von 8-9 ppm NO zum durchschnittlichen Wert auf. Dieser Fehler beeinflußt die Methämoglobinbildung namentlich bei kurzdauernden Inhalationen in starkem Maße.

Auch die Kurve aus der Versuchsreihe mit den geringsten NO-Gehalten (114,4 ± 2,6 und 115,1 ± 1,0 ppm NO) verläuft nach der gleichen Tendenz. Allerdings sind hier die Abweichungen vom idealen Kurvenverlauf z. T. nicht unerheblich (vgl. nicht ausgezogene Kreise in Abb. 3) , vor allem im Anfangsteil und auch im Bereich zwischen 4 Std und 6 Std . Die nähere Analyse ergibt nun aber, daß auch die tatsächlich inhalierten Durchschnittskonzentrationen bei dieser Versuchsserie schwankten. Um dies deutlich zu machen, sind in Abb. 4 für die Versuchsreihe mit rund 160 ppm,



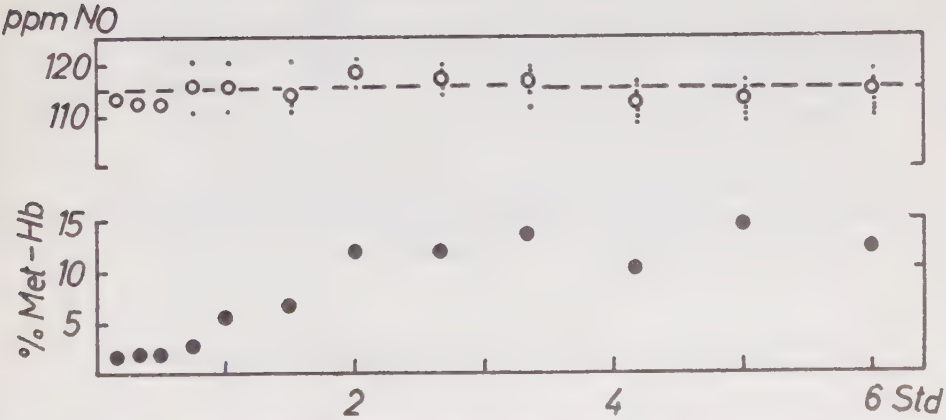


Abb.4: Zuordnung tatsächlich inhalierter NO-Konzentrationen zu Met-Hb-Gehalten im Mäuseblut.
Oberer Teil: Gesamtdurchschnitt 166,3 ppm NO.
Unterer Teil: Gesamtdurchschnitt 114,7 ppm NO. (vgl.auch Abb.3).

wie auch für die mit rund 115 ppm NO, die einzelnen Methämoglobingehalte den zugehörigen chemisch-analytischen Bestimmungen gegenübergestellt. Dabei wurde so vorgegangen, daß die Einzelbestimmungen (Punkte) wie auch die Durchschnittswerte (leere Kreise), die zu jeder Tiergruppe gehören, aufgeführt sind. Man sieht aus der Darstellung, daß größere Abweichungen der Methämoglobingehalte von der Idealkurve durch entsprechende Deviationen der NO- Konzentrationen vom Gesamtdurchschnitt erklärt werden. Damit ist insgesamt eine befriedigende Korrelation der NO- Gehalte in Luft zu den gebildeten Methämoglobinspiegeln ausgewiesen.

3. Stickstoffmonoxydkonzentration in der Einatmungsluft und Ausmaß der Methämoglobinbildung.

Nach Kenntnis der Bildungsgeschwindigkeit von Methämoglobin war zu klären, welche Endgehalte an Methämoglobin bei verschiedenen NO- Konzentrationen in der Atemluft erreicht werden. Dazu wurden 6 Std- Versuche mit Inhalation konstanter NO- Gehalte angesetzt. Die Konzentration des NO- Luftgemisches wurde bei insgesamt 29 Einzelversuchen zwischen 8,0 $\pm$ 0,4 ppm und 351,3 $\pm$ 1,9 ppm NO variiert. Um möglichst zuverlässige Resultate zu erhalten, setzten wir pro Versuch 10 Tiere ein.

Verfolgt man in Abb. 5 die aufgetragenen Methämoglo-

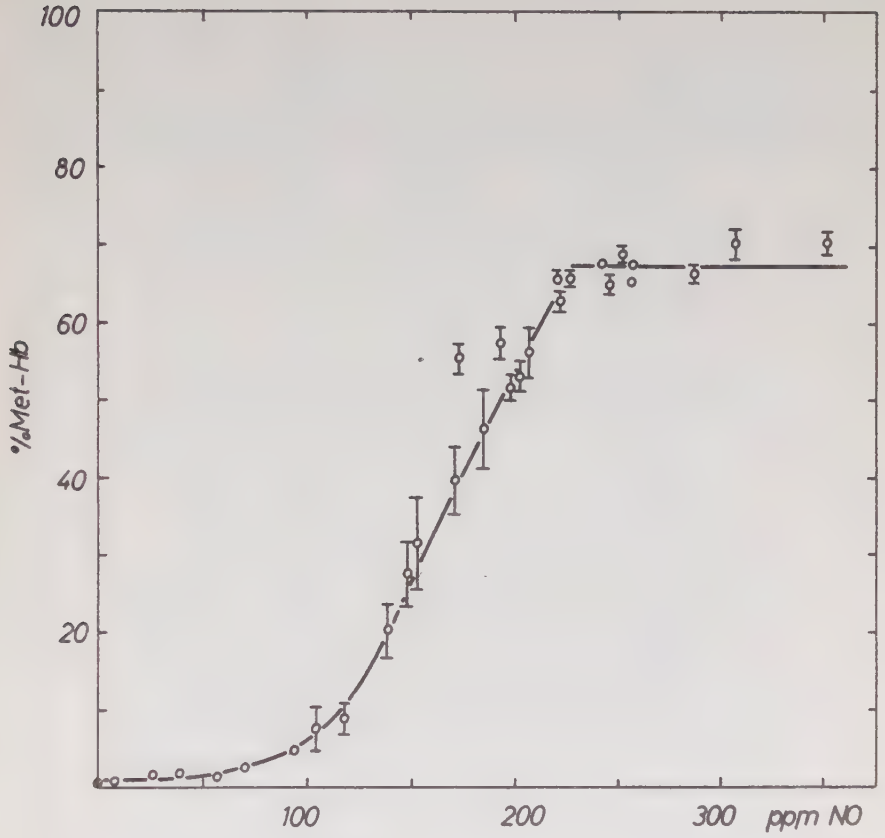


Abb.5: Methämoglobin-Gehalt im Mäuseblut nach 6 Std-Inhalation von Stickstoffmonoxyd.

binwerte im niedrigsten NO- Konzentrationsbereich, so ist eine Beeinflussung des Methämoglobinspiegels im Mäuseblut schon ab 8 ppm andeutungsweise erkennbar. Wie die tabellarische Übersicht der Ergebnisse (Tab. 1) zeigt, ist die Steigerung gegenüber der Norm von 0,8 % indessen hier noch gering, namentlich wenn man in Rechnung stellt, daß bei weiteren Vorversuchen normale Methämoglobingehalte bei der Maus bis zu 1,4 % gefunden worden waren.

Bei niedrigen NO- Konzentrationen setzt also die Methämoglobinbildung sehr langsam ein, das heißt die Kurve steigt nur sehr wenig mit der NO- Konzentration an. Die Streuung ist in diesem Bereich wegen ihrer Geringfügigkeit graphisch nicht darstellbar. Bei 100 ppm NO werden erst 7 % Methämoglobin angetroffen. Dann aber schlägt die Tendenz rasch um, indem zwischen 100 und 200 ppm ein steiler, praktisch kontinuierlicher Anstieg einsetzt. Dieser endet dann abrupt bei ungefähr 220 ppm; von dort ab verläuft die Kurve praktisch horizontal. In diesem Bereich ist, wie die Tabelle 1 zeigt, der tödliche Methämoglobinspiegel erreicht; mit anderen Worten: Ab etwa 200 ppm NO treten die ersten Todesfälle auf.

Es darf aber nicht übersehen werden, daß ein Versuch (Versuch Nr. 13 in Tabelle 1) aus der Kurve stark herausfällt. Mehrfache Wiederholungen in diesem Konzentrationsbereich brachten dann andere, recht genau in die Idealkurve passende Werte. Das berechtigt zu der Annahme, daß der herausfallende Wert durch einen methodischen Fehler bedingt ist. Die Ursache konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Versuch Nr.	ppm NO Phenoldisulfonsre.	spektr. photometr.	% Methämoglobin Mittelwert	mittl. Fehler v. Mittelwert ε	Min.-Max.	Mortalität	durchschn. Überlebenszeit (Std) Min.-Max.
Kontr.	Normalluft	0	0,79	0,11	0,6- 1,0	0/10	-
20	8,0±0,4	8	1,1	0,06	1,4- 0,8	0/10	-
19	26,6±1,1	27	1,7	0,11	1,2- 2,2	0/10	-
18	38,6±0,6	38	1,9	0,1	1,4- 2,6	0/10	-
10	56,9±0,7	58	1,4	0,1	0,9- 2,4	0/10	-
9	70,6±1,2	68	2,6	0,4	0,9- 4,9	0/10	-
11	94,4±0,8	93	4,9	0,8	2,2-11,3	0/10	-
12	104,7±2,0	103	7,6	2,8	2,6-32,2	0/10	-
8	117,8±3,4	116	8,9	2,0	2,1-23,6	0/10	-
17	138,2±2,5	136	20,2	3,5	7,8-41,2	0/10	-
7	148,4±2,0	149	27,6	4,3	11,7-51,2	0/10	-
14	152,8±2,3	154	31,7	6,0	12,8-63,1	0/10	-
32	171,4±2,5	173	39,9	4,6	16,3-66,6	0/10	-
13	172,7±2,1	175	55,2	2,0	42,0-62,1	0/10	-
38	184,7±1,4	186	46,5	5,3	18,0-60,7	0/10	-
35	192,7±2,1	191	57,6	2,0	48,2-64,8	0/10	-
21	197,7±1,8	200	51,8	1,9	42,4-62,2	1/10	1,7
23	202,1±1,2	201	53,3	2,1	41,5-60,1	1/10	2,5
52	206,7±2,2	207	56,4	3,5	30,3-66,2	1/10	3,4
46	220,1±2,3	215	65,8	1,3	58,5-71,4	2/10	2,3 (2,3-2,3)
22	221,9±1,3	224	62,9	1,3	57,1-68,7	0/10	-
53	226,4±2,3	223	65,8	1,3	60,9-72,7	3/10	3,0 (2,0-3,9)
34	242,1±1,7	241	68,2	1,0	62,5-72,3	4/10	3,2 (1,9-4,7)
33	246,1±2,0	249	65,0	1,3	60,3-69,5	2/10	3,3 (2,3-4,3)
36	252,2±2,6	251	69,0	1,2	63,7-74,1	2/10	1,7 (1,3-2,1)
40	256,8±2,4	258	65,5	0,7	61,9-68,3	2/10	1,9 (1,9-1,9)
54	257,3±1,5	263	67,8	0,9	63,6-72,3	3/10	2,5 (1,5-3,5)
43	288,2±2,4	295	66,5	1,2	63,0-73,6	9/10	1,2 (0,7-1,8)
48	307,4±1,2	311	70,4	1,9	59,9-78,4	8/10	1,3 (1,0-1,8)
49	351,3±1,9	355	70,5	1,4	65,8-80,1	9/10	1,06(0,7-1,4)

Tabelle 1: Ergebnisse der mit Stickstoffmonoxydluftgemischen durchgeführten Versuche.

Die Überlebenszeiten der bei hohen NO- Konzentrationen verstorbenen Tiere bewegen sich alle in der gleichen Größenordnung, nämlich zwischen 0,7 und 3,4 Stunden (vgl. Tab. 1).

Bläulich weiße Verfärbungen der Schnauze, Ohren, Pfoten und des Schwanzes prägten das Bild der Stickoxydvergiftung unserer Tiere. Die anfangs rosige Augenfarbe wechselte bis zu blau-violetten Verfärbungen und kurz vor oder bald nach Todeseintritt begann sich die Hornhaut zu trüben. Schwerere Krampfzustände blieben aus.

4. Rückbildung von Methämoglobin in vivo.

a) Nach Stickstoffmonoxydinhalation.

Die Reduktion von Methämoglobin zum physiologischen roten Blutfarbstoff bedarf der spezifischen Leistung von Enzymen, die an das Stroma der Erythrocyten gebunden sind. Ein gewisses Maß an Rückbildung besteht auch neben forcierter Neubildung. Unsere Bestimmungen der Methämoglobinspiegel nach Stickstoffmonoxydinhalation wurden daher nach 6stündiger Begasung vorgenommem, um sicher zu sein, daß Bildung und Rückbildung von Methämoglobin ein Gleichgewicht erreicht haben. Die NO- Konzentration sollte dabei zu Methä-

moglobinblutgehalten um 50 % führen.

Insgesamt wurden Messungen mit 8 Tiergruppen, jeweils aus 4 Mäusen bestehend, durchgeführt, wobei die erste 10 min , die letzte 8 Std nach der Exposition angesetzt worden war. Die in Abb. 6 aufgeführten Ergebnisse weisen zu Beginn ein sehr rasches, kontinuierliches Absinken des Methämoglobinspiegels aus. So sind 1 Std post expositionem lediglich noch 5,7 % Methämoglobin vorhanden. Im weiteren Verlauf nimmt die Rückbildungsgeschwindigkeit stetig ab, so daß erst nach der zweiten Stunde mit 1,28 % Met-Hb wieder ein normaler Methämoglobinspiegel erreicht wird.

b) Nach intravenösen $NaNO_2$- Gaben.

Zur Ermittlung der Methämoglobinrückbildung nach intravenösen $NaNO_2$- Gaben bestimmten wir zuvor anhand einer Vorversuchsreihe die Natriumnitritmenge pro g Lebendgewicht, die im Tierkörper eine 40 - 50 %ige Methämoglobinämie hervorruft. Diese Dosis wurde insgesamt 8 Dreiergruppen intravenös injiziert. Unsere Messungen erstreckten sich bis 5 Std nach der Zufuhr. Die in Abb. 6 den Resultaten von a) gegenübergestellten Ergebnisse lassen einen maximalen Methämoglobingehalt nach rund 20 min erkennen. Danach sinkt der Blutspiegel relativ langsam, und 3 Std nach der Injektion liegt er mit 1,7 % Met-Hb prak-

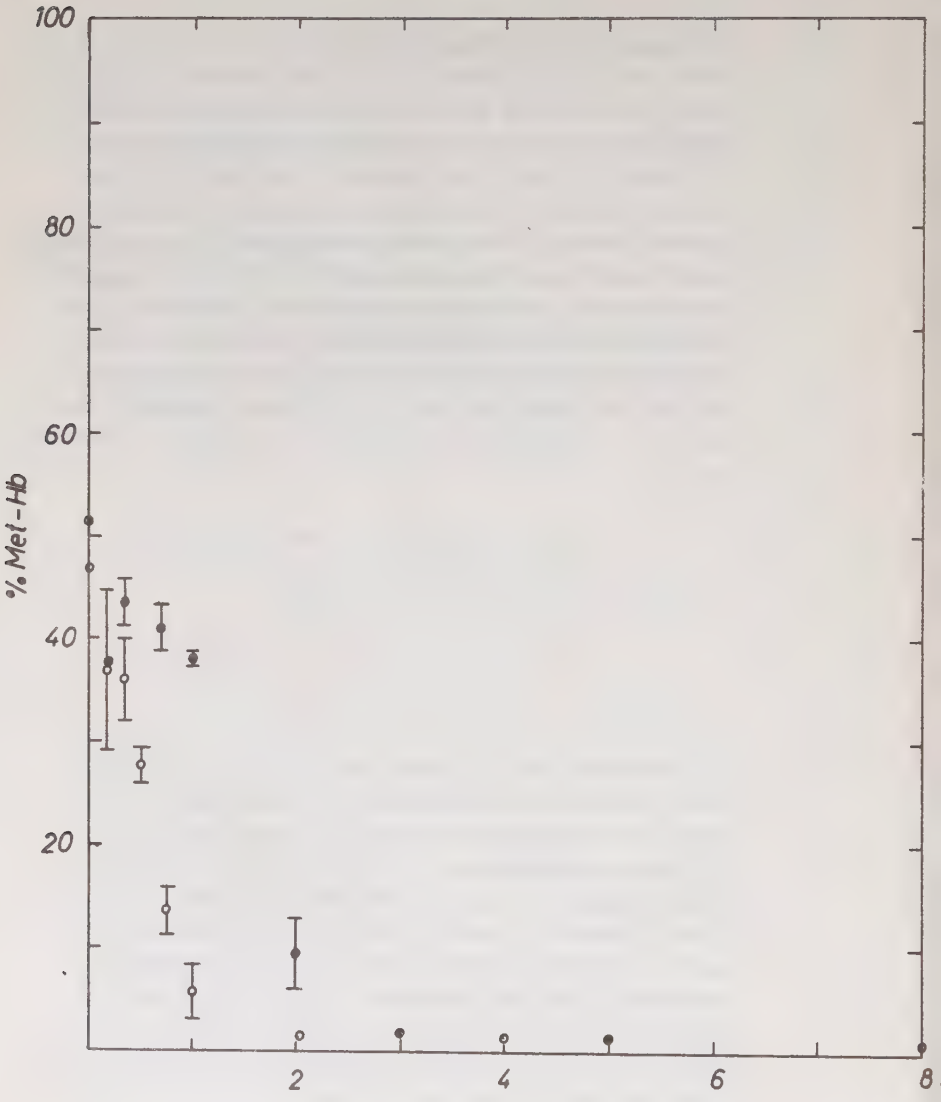


Abb.6: Rückbildung von Methämoglobin im Mäuseblut.

- ○ Nach Stickstoffmonoxyd-Inhalation.
- ● Nach intravenösen $NaNO_2$-Gaben.

~~tisch~~ wieder im Bereich der Norm. Nach 2 Std liegt er aber mit rund 10 % erheblich über dem nach NO-Inhalation gemessenen Wert.

D) DISKUSSION

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gingen von der Erwartung aus, daß das Reaktionsgeschehen bei der Umwandlung des roten Blutfarbstoffes in Methämoglobin durch Nitrit und nach Inhalation nitroser Gase identisch ist.

Bestimmungen des Methämoglobins im Tierversuch bei Katzen nach subcutaner Applikation von Natriumnitrit, die v. ISSEKUTZ (1939) vornahm, erbrachten ein streng lineares Ansteigen der Methämoglobinmengen mit der zugeführten Dosis. Theoretisch hätte diese Tendenz der Methämoglobinbildung in unseren Befunden nach Inhalation konstanter Stickstoffmonoxydkonzentrationen über verschiedene Zeiten eine Entsprechung finden müssen. Demgegenüber ließ die graphische Darstellung der Resultate unserer Versuchsreihen aber das charakteristische Bild von Sättigungskurven erkennen. Kurven dieser Art bilden sich insbesondere dann aus, wenn die aufgenommene Substanz im Organismus eine leicht reversible Bindung eingeht, oder wenn die neugebildete Verbindung durch spezielle Fermentsysteme einer raschen Entgiftung und Rückbildung unterworfen wird. Durch eine Reihe von Untersuchungen verschiedener Autoren ist erwiesen, daß die Reduktion des Methämoglobins in den Erythrocyten stattfindet. Die reduzierenden Stoffe, die fermentativer Natur sind, werden dort gebildet.

Die Empfindlichkeit des Blutes verschiedener Tierarten gegen methämoglobinbildende Gifte ist, nach Untersuchungen der Methämoglobinrückbildung in vivo und in vitro, von JUNG (1940); GELINSKY (1940) und KIESE u. WEIS (1943) als sehr unterschiedlich beschrieben worden. Eine Bestätigung dieser Auffassung brachten die Versuche von BETKE, GREINACHER u. TIETZE (1956), wonach die Oxydierbarkeit menschlicher und tierischer Hämoglobine durch Natriumnitrit teilweise nicht unerhebliche Differenzen zeigt. Der Blutfarbstoff der weißen Maus wies in diesem Zusammenhang eine auffallend große Unempfindlichkeit gegen Nitrit auf; denn seine Oxydation erforderte im Vergleich zum Hämoglobin des Menschen nahezu die 10fache Zeit. Diese Sonderstellung des Mäusehämoglobins erklärt jedoch nicht die Abflachung unserer Methämoglobinbildungskurven bis zu einem Plateau nach rund 4 Stunden.

Unsere Befunde lassen es vielmehr als möglich erscheinen, daß neben der Bindung von Stickstoffmonoxyd an das Hämoglobin noch andere Bindungsstellen dieses Gases im Organismus vorhanden sind. In diesem Zusammenhang müßte insbesondere dem Myoglobin eine Bedeutung beigemessen werden. Eine Voraussetzung für diese Annahme wäre allerdings, daß nicht alles Stickstoffmonoxyd nach dem Übertritt von der Lunge ins Blut in die Bildung von Methämoglobin eingeht, da diese Verbindung allgemein als beständig angesehen wird. Es kann aber auch sein, daß sich Stickstoffmonoxyd mit dem gebildeten Methämoglobin zu einer neuen Verbindung, dem Nitrit- Methämoglobin umsetzt. Die Absorptionskurve dieses Methämoglobinderivates, das 1881 von Kobert (KOBERT (1900)) entdeckt wurde, äh-

nelt stark derjenigen eines Gemisches aus Methämoglobin und Stickstoffmonoxydhämoglobin. Diese Erscheinung gab für HALDANE (1898); MEIER (1925); HAUROWITZ (1924) und andere Autoren Anlaß, die Existenz des Nitrit-Methämoglobins als eigene Verbindung überhaupt in Frage zu stellen. Aufgrund genauerer Analysen der Lichtabsorptionskurven, sowie anderer Befunde ist jedoch von HARTRIDGE (1920); JUNG u. REMMER (1948) und SCHWERD u. STUMPF (1961) Nitrit-Methämoglobin als eine Verbindung sui generis erkannt worden. JUNG u. REMMER (1948) glaubten, vom Nitrit-Methämoglobin noch eine Anlagerungsverbindung des Stickoxyds an das Methämoglobin abgrenzen zu können. Einen sicheren Beweis dafür erbrachten die Untersuchungen jedoch nicht.

Im lebenden Organismus konnte bislang allerdings Nitrit-Methämoglobin nicht nachgewiesen werden. Orientierende Untersuchungen von STOCK (1965) am Blut von mit Stickstoffmonoxyd tödlich vergifteten Mäusen haben bei spektrophotometrischer Analyse nur das Vorhandensein von Methämoglobin ausweisen können. Weder Nitrit-Methämoglobin noch Stickstoffmonoxydhämoglobin waren nachweisbar. Zudem ist Stickstoffmonoxydhämoglobin normalerweise nicht beständig, da es vom Blutsauerstoff sofort zu Methämoglobin oxydiert wird. Das Problem der Veränderungen von Hämoglobin durch Stickstoffmonoxyd bedarf zur Klärung noch weiterer Untersuchungen. Es könnte nämlich sein, daß bei der Prüfung des Mäuseblutes tatsächlich vorhandenes Nitrit-Methämoglobin im Zuge der Aufarbeitung (Hämolyse, Zentrifugieren und spektralphotometrische Ausmessung) in Methämoglobin umgesetzt

wird.

Auf das Vorliegen noch anderer Blutfarbstoffderivate neben Methämoglobin deutet insbesondere die Versuchsreihe über die Rückbildung von Methämoglobin nach Stickstoffmonoxydinhalation und nach intravenösen Natriumnitritgaben hin. Es wurde gefunden, daß nach der Einatmung des Gases der gebildete Methämoglobinblutspiegel sehr viel rascher als nach intravenöser Natriumnitritzufuhr auf normale, physiologische Werte rückgebildet wird. Hierbei wäre aber zu berücksichtigen, daß $NaNO_2$ nach rascher intravenöser Injektion nicht komplett in den Erythrocyten und mithin am Hämoglobin gebunden zu werden braucht, sondern daß gewisse Anteile ins Gewebe diffundieren könnten, ohne dort eine Umwandlung zu erfahren. Diese Anteile an $NaNO_2$ könnten sodann im Laufe der ersten Stunden ins Blut zurückdiffundieren und am Hämoglobin ihre Wirkung entfalten. Die Differenz der beiden gewonnenen Rückbildungskurven könnte so wenigstens zum Teil eine Erklärung finden. Die quantitativen Verhältnisse bedürfen aber zur genauen Abklärung noch weiterer Untersuchungen.

E) ZUSAMMENFASSUNG

Die Einatmung nitroser Gase führt zu zwei nach Art und Ort der Wirkung verschiedenen Vergiftungen. Als Lungengifte ätzen sie einmal die Atemflächen des Respirationstraktes, zum anderen verwandeln sie den roten Blutfarbstoff in Methämoglobin.

Stickstoffmonoxyd, das neben dem Dioxyd der toxikologisch bedeutsamste Bestandteil dieser Schadstoffe ist, kann unter besonderen Umständen den Hauptanteil beider Komponenten stellen. Seine Wirkung auf den Organismus beschränkt sich auf die Bildung von Methämoglobin.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Abklärung des Einflusses von reinen Stickstoffmonoxydluftgemischen in definierten, spektralphotometrisch und chemisch-analytisch kontrollierten Konzentrationen auf den normalen Methämoglobinblutspiegel der Maus. Die Methämoglobinbestimmungen erfolgen nach einer Modifikation der Methode von EVELYN u. MALLOY.

In systematischen Versuchen werden folgende Befunde erhoben: Eine Exposition über abgestufte Zeiten mit konstant gehaltenen Stickstoffmonoxydkonzentrationen erzeugt Methämoglobingehalte, deren graphische Darstellung die typischen Merkmale von Sättigungskurven erkennen läßt. Die zu Beginn steil ansteigenden Methämoglobinwerte flachen kontinuierlich ab, bis nach rund 4stündigen Expositionen ein Gleichge-

wicht erreicht wird.

Die Endgehalte an Methämoglobin nach 6stündiger Inhalation differenter Konzentrationen folgen einem S-förmigen Anstieg, der im Bereich um 220 ppm NO mit Methämoglobingehalten von knapp 70%, der zum Tode führenden Konzentration, abrupt endet. Erst eine Stickstoffmonoxydkonzentration von 10-15 ppm erhöht deutlich meßbar den normalen Methämoglobinblutspiegel.

Die Rückbildung einer Methämoglobinämie wird einmal nach Stickstoffmonoxydinhalation, zum anderen nach intravenösen $NaNO_2$-Gaben verfolgt. Nach der Einatmung des Gases läßt sich bereits nach 2 Std Methämoglobin nicht mehr nachweisen. Die Reduktion nach intravenöser $NaNO_2$-Zufuhr verläuft demgegenüber deutlich verzögert; bei nahezu gleich hohen Methämoglobinausgangswerten werden 2 Std post injectionem noch rund 10% Met-Hb gefunden, nach 3 Std liegen auch hier die Werte wieder im Bereich der Norm.

Die Befunde stellen die Auffassung in Frage, daß nach Inhalation von Stickstoffmonoxydgas ausschließlich Methämoglobin gebildet wird. Es werden deshalb weitere Möglichkeiten von Umsetzungen des Stickstoffmonoxydmoleküls im Organismus diskutiert.

Herrn Professor Dr. D. H e n s c h l e r sage ich ergebensten Dank für die am Institut für Toxikologie und Pharmakologie gebotene Arbeitsmöglichkeit, für die Überlassung des Themas, sowie für die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit.

F) LITERATUR

BEIKE,K., I.GREINACHER u. O.TIETZE: Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch $NaNO_2$. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.u.Pharmak. 229, 220 (1956).

BODENSTEIN,M.: Die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Stickoxyd und Sauerstoff.- Z. Elektrochem. 24, 183 (1918).

BURN,J.H.: Biologische Auswertungsmethoden.- Verlag Julius Springer, Berlin (1937).

EVELYN,K.A. and H.T.MALLOY: Microdetermination of oxyhemoglobin and sulphhemoglobin in a single sample of blood.- J.biol.Chem. 126, 655 (1938).

FATELY,W.G., H.A.BENT and B.CROWFORD: Infrared spektra of the frozen oxides of N.- J.Chem.Phys. 31, 204 (1959).

FLURY,F.: Die Rolle des Stickstoffmonoxyds bei der Vergiftung durch nitrose Gase.- Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.u.Pharmak. 157, 104 (1930).

FLURY,F. und F.ZERNIK: Schädliche Gase.- Verlag Julius Springer, Berlin (1931).

GELINSKY,G.: Studien über Methämoglobinbildung.- Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Path.u.Pharmak. 195, 460 (1940).

HAHN,E.Th.: Med.Inaug.-Diss. Würzburg (1960).

HALDANE,J.: Beitrag zur Chemie des Hämoglobins und seiner unmittelbaren Derivate.- J.Physiol.(Brit.) 22, 298 (1898).

HARTRIDGE,H.: Nitrite methemoglobin and related pigments.- J.Physiol. (Brit) 54, 253 (1920).

HAUROWITZ,F.: Zur Kenntnis des Methämoglobins und seiner Derivate.- Z.physiol.Chem. 138, 68 (1924).

HENSCHLER,D, A.STIER, H.BECK, u. W.NEUMANN: Geruchsschwellen einiger wichtiger Reizgase (Schwefeldioxyd, Ozon, Stickstoffdioxyd) und Erscheinungen bei der Einwirkung geringer Konzentrationen auf den Menschen.- Arch.für Gewerbepath. u. Gewerbehyg. 17, 547 (1960).

v. ISSEKUTZ jun.,B.: Studien über Methämoglobinbildung. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.u.Pharmak. 193, 551 (1939).

JACOBS,M.B.: The Chemical Analysis of Air Pollutants,- Interscience Publishers, New York-London. 209, 351 (1960).

JUNG,F.: Studien über Methämoglobinbildung.- Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.u.Pharmak. 195, 208 (1940).

JUNG,F. u.H.REMMER: Über die Umsetzung zwischen Nitrit und Hämoglobin.- Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path. u. Pharmak. 206, 459 (1949).

KIESE,M.u.B.WEIS: Die Reduktion des Hämiglobins in den Erythrocyten verschiedener Tiere.- Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.u.Pharmak. 202, 493 (1943).

KOBERT,R.: Beiträge zur Kenntnis der Methämoglobine.- Pflügers Arch.Physiol. 82, 603 (1900).

LÜTGE.W.: Zahnmed.Inaug.-Diss. Würzburg (1961).

MEIER,R.: Studien über Methämoglobinbildung.- Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.u.Pharmak. 110, 241 (1925).

PFLESSER,G.: Die Bedeutung des Stickstoffmonoxyds bei der Vergiftung durch nitrose Gase.- Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.u.Pharmak. 179, 545 (1935).

SCHWERD,W.: Der rote Blutfarbstoff. Verlag Schmidt-Römhild,Lübeck 1962,S.86 ff.

SCHWERD,W.u.R.STUMPF: Spektrophotometrische Untersuchungen über Nitrit-Methämoglobin und Stickoxyd-Hämoglobin.- Blut, Z. für Blutforschung. Bd.VII,341 (1961).

STOCK,D.: Med.Inaug.-Diss. Würzburg (1965).

L E B E N S L A U F

Am 5. Februar 1939 wurde ich, Hermann Ulrich Mangold, als zweites Kind des Bezirksvorstehers Jakob Mangold und seiner Ehefrau Elise, geb. Munk, in Stuttgart geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Stuttgart-Untertürkheim kam ich anschließend an das dortige Gymnasium, wo ich 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1958 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Zahnheilkunde. Im Sommer 1961 bestand ich an der Universität Würzburg die zahnärztliche Vorprüfung. Im September 1964 schloß ich dort mein Studium mit der zahnärztlichen Prüfung ab.

Im September 1965 wurde ich zur Ableistung meines Wehrdienstes in die Bundeswehr einberufen. Seit Anfang 1967 bin ich als Ausbildungsassistent in der Schweiz tätig.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

ulrich mangold.

Offset-Druck Gugel, Burkarderstraße 9 Würzburg

Offset-Druck Gugel, Burkarderstraße 9 Würzburg